RAPID'*Listeria* spp/Gélose

356-3950
356-4744

DOMAINE D'APPLICATION

Milieu **chromogénique** sélectif pour la recherche et le dénombrement des ***Listeria spp*** dans les produits destinés à l'alimentation humaine et les prélèvements de l'environnement.

PRINCIPE

Le milieu RAPID'*Listeria* spp permet de mettre en évidence les *Listeria spp* grâce à la détection de l'activité β-D-glucosidase par un substrat chromogénique. Les colonies de Listeria sont bleues à bleue-vertes.
La sélectivité du milieu est obtenue par l'action combinée du Chlorure de Lithium et du mélange antibiotique.

NF VALIDATION par AFNOR CERTIFICATION selon le protocole EN ISO 16140

La méthode RAPID'*L.spp* est certifiée NF VALIDATION comme méthode alternative à la norme de référence NF EN ISO 11290-1, selon le protocole ISO 16140, pour la **recherche des *Listeria spp*** pour tous produits d'alimentation humaine et pour les échantillons d'environnement.
La date de fin de validité de l'attestation est : 15/12/2014

BRD 07/12 – 12/06
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSES POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.com

VALIDATION AOAC-RI

RAPID'*Listeria spp* est validé AOAC Research Institute selon le protocole « Performance Methods Tested ».
Certificate n°: 080701.

REFERENCES NORMATIVES

Département US de la Santé et des Services Humains, Administration de l'Alimentation et de la Santé, Centre pour la sécurité alimentaire et la nutrition appliquée, Bactériologique, Analytique, Manuel en ligne, Janvier 2003.

NF EN ISO 11290-1/A1 (Février 2005)
Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Listeria monocytogenes – Partie 1 Méthode de recherche (IC : V08-028-1)

NF EN ISO 11290-2/A1 (Février 2005)
Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Listeria monocytogenes – Partie 2 Méthode de dénombrement (IC : V08-028-2)

PRESENTATION

Déshydraté

- 500g **code 356-4744**
- Supplément 1 (10 flacons, qsp 500 ml de gélose de base) **code 356-4745**
- Supplément 2 (10 flacons, qsp 500 ml de gélose de base) **code 356-4746**

Précoulé

- 90 mm x 20 boîtes **code 356-3950**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Précoulé et suppléments: + 2 - 8 ℃ à l'obscurité.
- Déshydraté : 15-25℃, flacon soigneusement fermé dans un endroit sec et frais.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Peptones	20 g
Extrait de levure	1 g
Pyruvate de sodium	2 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Maltose	1 g
Chlorure de sodium	4 g
Chlorure de Lithium	10,5 g
Silice	20 g
Activateurs de croissance	2 g
Mélange chromogénique	75 mg
Mélange antibiotique	40 mg
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml

pH final (25℃) = 7 - 7.5

Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré • 92430 Marnes-la-Coquette
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00 • Fax : +33 (0)1 47 41 91 33
www.foodscience.bio-rad.fr

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) NON FOURNI(S)

• Diluant Tryptone-Sel :
9 ml x 25T **(ex. code 355-5754)**
500 g **(ex. code 356-4544)**
5 poches de 2,3 l **(ex. code 355-5791)**

• Bouillon FRASER 1/2 :
Prêt à l'emploi (complet):
6 flacons de 225 ml **(ex. code 355-5797)**
5 poches de 2,3 l **(ex. code 355-5788)**
Déshydraté (base) :
500 g **(ex. code 356-4604)**
Supplément sélectif lyophilisé : Coffret de 10 flacons **(ex. code 356-4616)**

• Gélose PALCAM :
20 boîtes de 90 mm **(ex. code 356-3674)**
Déshydraté 500 g **(ex. code 356-4754)**
Supplément **(ex. code 356-4752)**

• Gélose RAPID'*L Mono* :
20 boites de 90 mm **(code 356-3694)**
Kit (flacon + supplément) **(code 355-5294)**

Voir Fiche(s) Technique(s) correspondante(s)

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

(liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Agitateur-homogénéisateur
- Boîtes de Pétri stériles (Ø = 90 ou 140 mm)
- Pipettes stériles (0,1 ml ; 1 ml…..)
- Ecouvillons stériles
- Pipettes Pasteur stériles
- Bains-marie avec une précision de ± 1 °C
- Etuve ou enceinte thermostatée avec une précision de ± 1 °C
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

MODE D'EMPLOI

« Toujours agiter avant chaque utilisation »

Dissoudre 71,5 g de poudre dans 950 ml d'eau distillée. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 47-50°C. Pour 1 litre de milieu, ajouter aseptiquement 2 flacons de supplément 1 (code 356-4745) reconstitués chacun avec 25 ml d'eau stérile. Bien homogénéiser. Pour 1 litre de milieu, ajouter 2 flacons de 5 ml de supplément 2 (code 356-4746). Bien homogénéiser. pH 7 – 7,5. Répartir en boites de Pétri stériles.
Conserver le flacon soigneusement fermé dans un endroit sec et frais.

Taux de reconstitution : 71,5 g /L

500 g de poudre permettent de réaliser 7 litres de milieu

PROTOCOLE

• Recherche des *Listeria spp* dans ηg ou ηml d'echantillon:

• Préparation de l'échantillon/ Enrichissement sélectif

- Ensemencer η g ou η ml de l'échantillon dans 9 x η ml de bouillon FRASER 1/2.
- Incuber à 30 °C (± 1 °C) pendant 24 heures (± 2 h).

Note : dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les prises d'essai supérieures à 25g n'ont pas été testées.

Après incubation, le bouillon d'enrichissement sélectif FRASER ½ peut être conservé au froid (3°C ±2°C) pendant 72h, avant ensemencement de RAPID'*Listeria* spp.

• Isolement et Incubation

- Prélever 0,1 ml de bouillon Fraser ½ en fin d'incubation avec une pipette stérile et les déposer en goutte sur le bord "extérieur" de la moitié de la gélose RAPID'*Listeria* spp *(schéma 1)*.
- Avec un écouvillon stérile, étaler par va et vient sur la moitié de la boîte (*schéma 2*)
- Avec une pipette Pasteur stérile, en partant de la fin de l'étalement, isoler en stries "relativement serrées" l'étalement sur toute la boite. (*schéma n°3)*
- Incuber les boîtes à l'envers à 37°C (± 1°C) pendant 24h (± 2 h).

Schéma 1 :

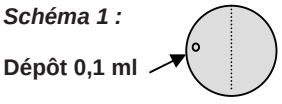


***Schéma 2* :**

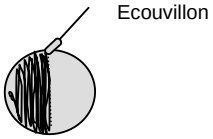
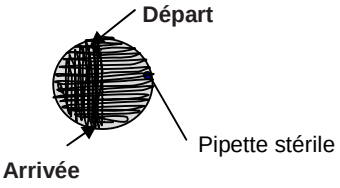


***Schéma n°3* :**



• Lecture

- Réaliser une lecture après l'incubation.
  Les *Listeria spp* présentent des colonies caractéristiques sur RAPID'*Listeria* spp de couleur bleues à bleues vertes.

Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré • 92430 Marnes-la-Coquette
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00 • Fax : +33 (0)1 47 41 91 33
www.foodscience.bio-rad.fr

Note : La lecture jusqu'à 48 heures d'incubation de la gélose RAPID *Listeria* spp est possible**.**

Après incubation, les géloses RAPID*'Listeria* spp peuvent être conservées au froid (3℃ ±2℃) pendant 48h avant lecture et confirmation éventuelle.

Note 1 :
Dans le cas d'absence de colonies caractéristiques sur RAPID'*Listeria* spp, on peut conclure à l'absence de *Listeria spp* (et donc à l'absence de *Listeria monocytogenes*).

Note 2 :
En cas de présence de colonies caractéristiques sur RAPID'*Listeria* spp la confirmation et l'identification des espèces peut être réalisée.

• Confirmation des colonies caractéristiques
Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, la confirmation doit être effectuée selon une des manières suivantes :

1- Par l'utilisation des **tests classiques** décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification)ou par l'utilisation de **sondes nucléiques** ayant fait l'objet d'une validation comme par exemple la PCR **iQ-Check™** *Listeria spp.* (code **357-8113)** à partir des colonies isolées (avec ou sans l'étape de purification).

2- **Repiquage par spot** d'au moins une colonie isolée à partir de RAPID'*Listeria* spp*,* sur gélose **RAPID'*L.mono***, complété par un test de Gram et de catalase. Il est possible de confirmer jusqu'à 15 colonies sur une boite de gélose RAPID'*L.mono*.
Ou **Repiquage par spot** d'au moins une colonie isolée à partir de RAPID'*Listeria* spp*,* sur gélose **PALCAM**. Il est possible de confirmer jusqu'à 15 colonies sur une boite de gélose PALCAM.

3- L'utilisation de toute **autre méthode certifiée NF VALIDATION**, de **principe différent** du RAPID' *Listeria* spp. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.

En cas de résultats discordants (positifs par la méthode RAPID' *Listeria* spp , non confirmé par l'une des options décrites ci-dessus) le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.

• Expression des résultats/Calculs
Se reporter aux normes ISO 11290-1 et 2, ISO 7218

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les précautions d'usage relatives à la manipulation de produits potentiellement contaminés, dans un laboratoire de microbiologie doivent être observées.
- Avant d'utiliser les boîtes de *RAPID'Listeria* spp, laisser sécher, selon la norme ISO 7218, à 25 ℃ - 50 ℃ jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu. Toutefois, éviter un séchage prolongé qui pourrait altérer les performances du milieu.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire (EN ISO 7218).

CONTROLE QUALITE

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.
Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.
La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

QUALITE ET PERFORMANCES DU TEST

MICRO-ORGANISMES	Aspect des colonies après 24 heures d'incubation à 37 ℃	
	CROISSANCE	COULEUR
Listeria monocytogenes ATCC 35152	+	Bleue
Listeria innocua ATCC 33090	+	Bleue
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibition	NA
Enterococcus faecalis ATCC 19433	Inhibition	NA

NA = Non applicable

MOTS CLES

RAPID'*Listeria* spp / Listeria / *Listeria monocytogenes* / Détection / Dénombrement / Produits alimentaires/ Environnement / Fraser / Glucosidase / Chromogénique / Milieu.

Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré • 92430 Marnes-la-Coquette
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00 • Fax : +33 (0)1 47 41 91 33
www.foodscience.bio-rad.fr

BIBLIOGRAPHIE

• **OTTAVIANI F., OTTAVIANI M., AGOSTI M. (1997b):** Differential agar medium for Listeria monocytogenes. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. **16-18** June 1997.

Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré • 92430 Marnes-la-Coquette
Tel. : +33 (0)1 47 95 60 00 • Fax : +33 (0)1 47 41 91 33
www.foodscience.bio-rad.fr